基础研究

远华蟾蜍精通过调节应激与凋亡通路诱导结直肠癌细胞的凋亡

梁顺添[1,2],李 源[1],李晓武[1,2],王俊江[2],谭福仙[1],韩钦芮[1],李 璐[1],姚学清[1,2],孙学刚[1]
[1]南方医科大学中医药学院,广东 广州 510515;[2]广东省人民医院//广东省医学科学院普外一区胃肠外科,广东 广州 510120

摘要:目的 研究远华蟾蜍精对结直肠癌(CRC)细胞活力及凋亡的作用,并分析其抑制细胞活力及诱导细胞凋亡的机制。**方法** 四甲基偶氮唑盐法检测远华蟾蜍精对CRC细胞活力的影响,细胞核荧光染色及流式细胞术检测TBG对肿瘤细胞凋亡的作用;免疫荧光检测线粒体膜电位及细胞内ROS水平,Western blotting及应激与凋亡信号抗体芯片检测TBG作用于肿瘤细胞后凋亡相关蛋白表达变化。**结果** TBG以浓度和时间依赖关系显著抑制HCT116、SW480的细胞活力;TBG诱导HCT116细胞发生核固缩,形成凋亡小体,增加Annexin V阳性细胞率;TGB上调细胞p53基因和Bax蛋白表达,促进Caspase9和PARP发生片段化;抗体芯片发现该药诱导肿瘤细胞中Bad磷酸化和PARP片段化,抑制了IKBα、TAK1蛋白磷酸化和Survivin蛋白表达。**结论** TBG通过诱导细胞凋亡而显著抑制CRC细胞活力,其凋亡诱导作用可能与p53介导的Bax通路活化及IAP通路的阻断相关。

关键词:远华蟾蜍精;结直肠癌;凋亡;抗体芯片

Mechanism of colon cancer cell apoptosis induced by telocinobufagin: role of oxidative stress and apoptosis pathway

LIANG Shuntian[1,2], LI Yuan[1], LI Xiaowu[1,2], WANG Junjiang[1,2], TAN Fuxian[1], HAN Qinrui[1], LI Lu[1], YAO Xueqing[2], SUN Xuegang[1]
[1]School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Department of Gastrointestinal Surgery, Guangdong General Hospital//Guangdong Academy of Medical Science, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To investigate the effects of telocinobufagin on viability and apoptosis of colorectal cancer (CRC) cells and explore the mechanism of telocinobufagin-induced apoptosis. **Methods** MTT assay was performed to detect the viability of CRC cells exposed to telocinobufagin. Nuclear staining with Hoechst 33342 and flow cytometry were used to analyze the cell death of CRC cells. Expressions of proteins related with cell apoptosis and oxidative stress were determined with Western blotting. **Resuts** Telocinobufagin decreased the viability of CRC cells in a time- and dose-dependent manner. The presence of karyopycnosis and apoptotic bodies together with the results of flow cytometry suggested that telocinobufagin induced cell apoptosis to cause cell death. Western blotting showed that telocinobufagin exposure of the cells resulted in upregulated p53 and Bax protein expressions and promoted cleavage of caspase 9 and PARP. Telocinobufagin induced phosphorylation of Bad and PARP cleavage, and suppressed phosphorylation of IKBα and TAK1 and expression of survivin in the cells. **Conclusion** Telocinobufagin can decrease the viability of CRC cells by inducing cell apoptosis, which involves p53-mediated Bax activation and inhibition of the IAP pathway.

Key words: telocinobufagin; colorectal cancer; apoptosis; antibody array

结直肠癌(CRC)是常见恶性肿瘤,发病率位居2015年我国恶性肿瘤发病男性的第5位和女性第4位,估计2015年CRC新发病人数为37.6万人,死亡人数达到19.1万人[1]。术后40%~50%患者出现术后复发或转移,其中绝大多数患者失去再治愈的机会;约20%病人在诊断时即处于转移阶段,其中位生存期低于2年[2],该类晚期或转移CRC对化疗药物的反应仅有10%~20%,导致CRC的远期预后很差[3]。

《医学入门》记载蟾酥:"主痈疽疔肿瘰疬,一切恶疮顽癣";《本草纲目》:"治发背疔疮,一切恶肿"。我们此前的研究显示,蟾酥成分沙蟾毒精诱导结肠癌细胞发生凋亡,线粒体磷酸甘油酸变位酶5L(PGAM5L)与动力相关蛋白1以及Bax形成复合物对于内源性凋亡的执行是必需的[4]。远华蟾蜍精(TBG)是从中华大蟾蜍蟾酥中提取纯化的活性成分之一[5],但TBG对CRC的作用尚未见报道。本实验旨在分析TBG对CRC细胞活力的影响并对其可能的分子机制进行探讨。

收稿日期:2016-03-12
基金项目:广东省社会发展领域科技计划项目(2014A020212636);2015年广东大学生科技创新培育专项资金("攀登计划"专项资金);南方医科大学2015年度国家级、省级、校级大学生创新创业训练计划项目(20151212100)
作者简介:梁顺添,硕士,E-mail: 491620090@qq.com;李 源,本科。梁顺添、李 源共同为第一作者
通信作者:姚学清,博士,主任医师,博士生导师,E-mail: yjb9211@21cn.com;孙学刚,博士,教授,博士生导师,电话:020-61648541,E-mail: sxg_smu@126.com

1 材料和方法

1.1 细胞系及主要试剂

人结肠腺瘤上皮细胞系SW480细胞、HCT 116购自美国模式培养物集存库，由南方医科大学中医药学院分子生物实验室保存；远华蟾蜍精购自宝鸡市辰光生物科技公司；细胞培养基RPMI 1640(Hyclone)；胎牛血清(Gibco)；四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)购自MP；DCFH-DA够自Sigma；Hoechst 33342试剂盒(上海鼎国生物技术公司)；AnnexinV-7AAD细胞凋亡检测试剂盒(美国BD)；JC-1够自MCE公司；p53、Bax、Caspase 9、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]一抗、Stress and Apoptosis Signaling Antibody Array Kit购自美国CST。

1.2 MTT法检测细胞活力

收集对数期细胞，调整细胞密度约1×10^5/孔。细胞贴壁后，分别加入浓度梯度的TBG(0、0.1、1.0、2.5、5、10 μmol/L)，分别培养24、48 h后，每孔中加入5 mg/mL MTT 20 μL。酶联免疫检测仪$A_{490\ nm}$处测量吸光值。细胞生存率=处理组吸光度值/对照组吸光度值，实验重复3次。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

TBG处理细胞24 h，收集细胞，按照我们此前建立的方法，选用Annexin V-PE/7AAD双染试剂盒，操作按试剂盒操作指南进行[4]，实验重复3次。

1.4 Hoechst 33342染色

贴壁细胞弃培养基，用PBS清洗1~2次。每孔加入35 μL Hoechst 33342工作液，置于37 ℃温育15~20 min。弃去Hoechst 33342染液，PBS洗涤1~2次，用荧光显微镜拍照分析[4]。

1.5 ROS和线粒体膜电位分析

应用DCFH-DA和JC-1分别检测细胞内ROS和线粒体膜电位。DCFH-DA孵育30 min，无血清培养液冲洗HCT116细胞3次，15 min内各孔荧光强度流式细胞仪检测，结果以与对照组ROS含量的百分比表示。0.5 mL JC-1工作液染色后，加入250 μL 1×缓冲液，经FACSCalibur流式细胞仪检测，用Cel1Quest软件分析荧光相对强度，观察细胞线粒体膜电位的变化。

1.6 蛋白免疫印迹检测蛋白表达

用BCA法蛋白定量后，每组取约30 μg蛋白样品，加入5倍上样缓冲液后上样至12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，湿转法转印至聚偏氟乙烯膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h。一抗4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶偶联的相应二抗(1:1000稀释)室温孵育1 h。最后用增强化学发光法显色、曝光。每组样品重复上样检测3次。目的条带用Image J软件分析相对灰度值(以β-actin为参照)[7]。

1.7 应激与凋亡信号抗体芯片检测相关蛋白变化

TBG处理24 h后，应用全蛋白抽提试剂盒提取蛋白，蛋白用BCA法进行蛋白定量后，每组取约0.5~1 μg/μL浓度的蛋白样品加入组装好的对应黑色多孔隔离槽中过夜孵育。次日用试剂盒中的复合一抗室温震荡反应1 h，辣根过氧化物酶偶联的相应二抗室温震荡孵育0.5 h。最后配置混合后显影试剂用化学发光数字成像仪曝光。目的靶点用Image J软件分析相对灰度值(以阳性对照为参照)。

1.8 统计学处理

采用SPSS20.0软件，数据以均数±标准差表示，采用单因素方差分析，若方差齐，组间多重比较采用LSD方法检验；若方差不齐多重比较采用Dunnett's T_3，$P<0.05$被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TBG抑制CRC细胞活力

分别用0、0.1、1.0、2.5、5、10 μmol/L TBG处理HCT116、SW480和NCM460 3种细胞24 h和48 h，TBG以浓度及时间依赖方式降低CRC细胞活力HCT116和SW480的细胞活力，到5 μmol/L细胞增殖抑制率达到平台水平(图1A,B)。TBG对人正常肠上皮细胞NCM460的杀伤作用较结肠癌细胞减弱(图1C)。HCT116细胞的24 h IC_{50}值为3.93 μmol/L，SW480细胞的24 h IC_{50}值为5.10 μmol/L，NCM460细胞的24 h IC_{50}值为34.7 μmol/L，表明TBG对CRC肿瘤细胞有更强杀伤作用。

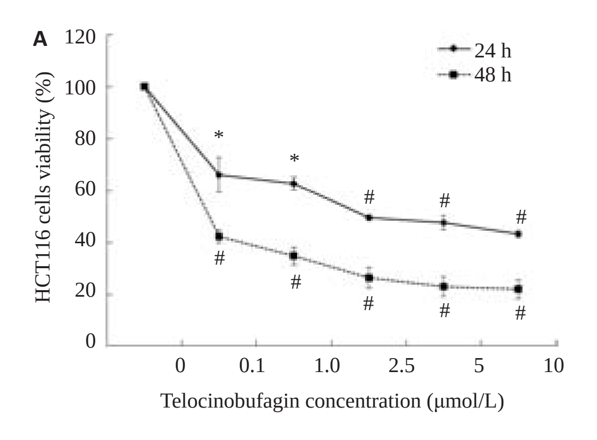
2.2 TBG诱导HCT116细胞凋亡

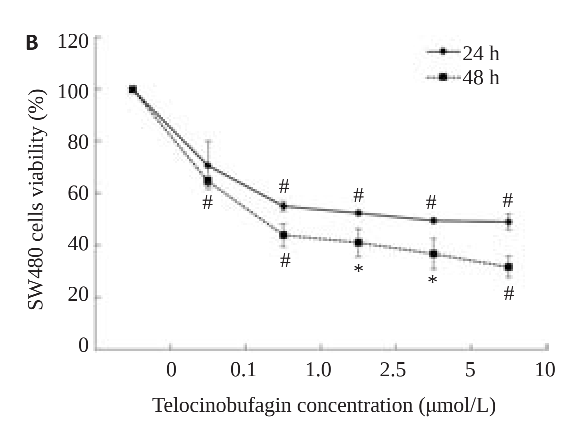
Annexin V-PE/7AAD双染的流式细胞分析结果显示(图2A)，随着TBG浓度的增加，HCT116的细胞凋亡率逐步上升。0.1、1.0、2.5 μmol/L TBG引起的Annexin V阳性细胞比例分别是(7.63±0.33)%、(9.33±0.76)%、(12.24±0.91)%(图2C)，表明TBG显著增加HCT116细胞凋亡率。

Hoechst 33342染色显示，TBG诱导细胞出现染色质凝集，发生核固缩，形成大量典型的凋亡小体(图2B)，0.1、1.0、2.5 μmol/L引起细胞凋亡的比例分别是(6.43±0.93)%、(9.57±0.68)%、(14.37±0.85)%(图2D)。结合流式细胞仪分析结果，表明TBG能以剂量依赖的方式促进CRC细胞发生凋亡。

2.3 TBG诱导CRC细胞内ROS增加和线粒体膜电位降低

TBG处理24 h，应用荧光探针CM-H2DCFDA观察细胞内ROS，TBG显著增加细胞内ROS水平(图3A)；应用JC-1染色监测线粒体膜电位，发现TBG以剂量依赖的方式显著降低CRC细胞线粒体膜电位(图3B)。





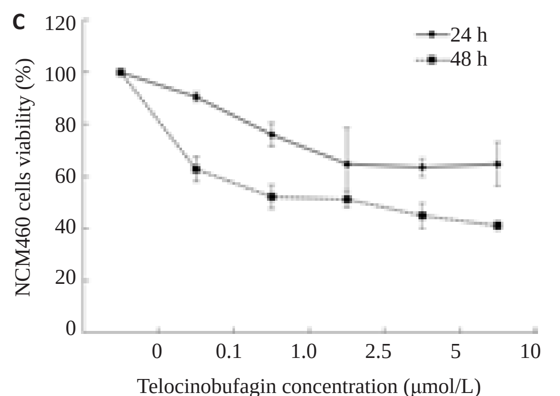
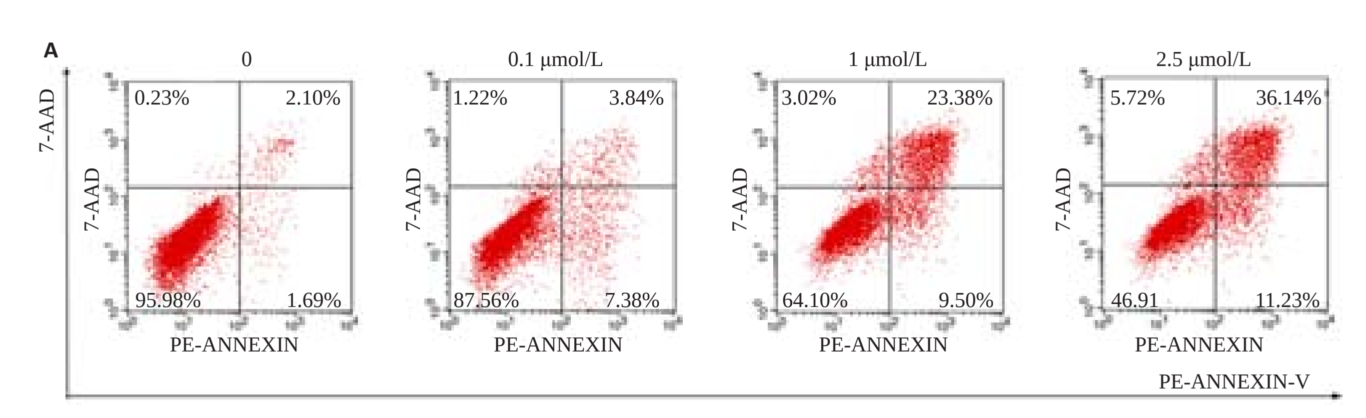


图1 TBG对HCT116、SW480和NCM460细胞活力的影响

Fig.1 Effects of telocinobufagin on viability of HCT116 (*A*), SW480 (*B*) and NCM460 (*C*) cells assessed with MTT assay. **P*<0.05, ‡*P*<0.01 *vs* control (0 μmol/L).



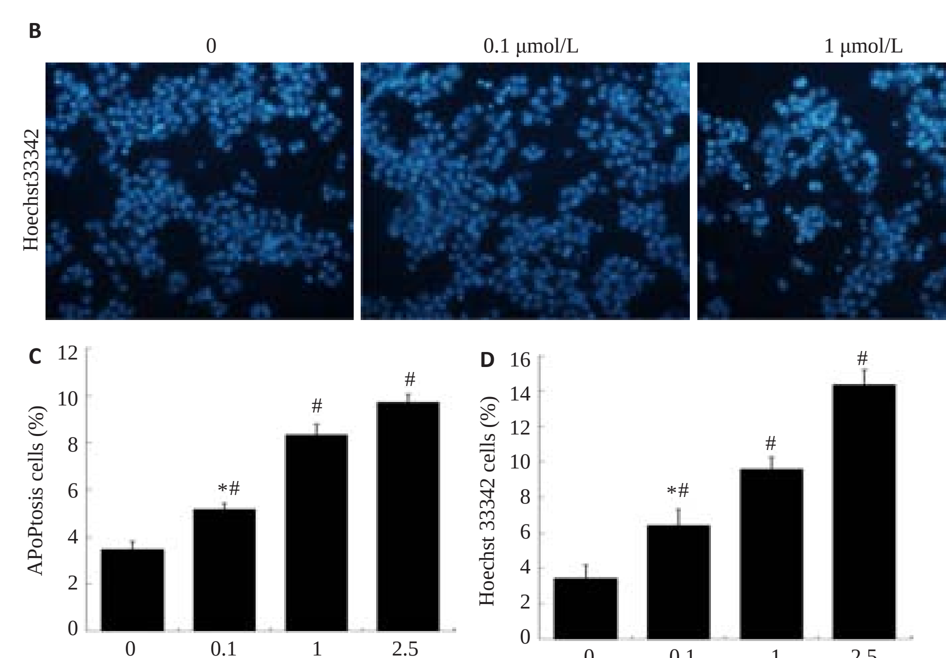


图2 TBG对HCT116细胞凋亡的作用

Fig.2 Effect of telocinobufagin on apoptosis of HCT116 cells. *A*: Annexin V-positive cells detected by flow cytometry; *B*: Apoptotic body-positive cells detected by Hoechst 33342 staining (Original magnification: ×200). *C*: Quantitative analysis of apoptosis detected by flow cytometry; *D*: Quantitative analysis of apoptotic body-positive cells. **P*<0.05, ‡*P*<0.01 *vs* control (0 μmol/L).

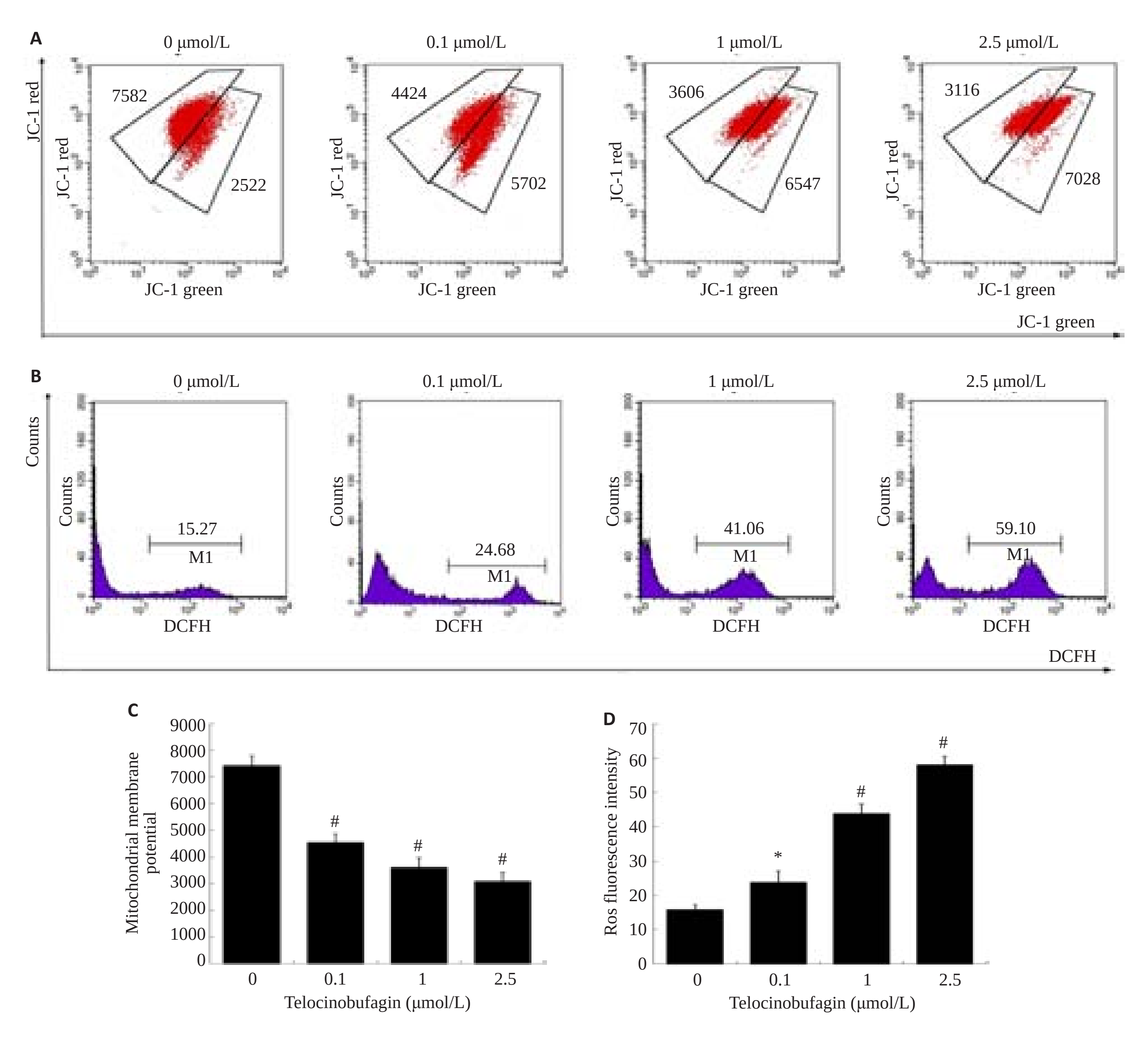


图3 TBG对CRC细胞线粒体膜电位和ROS水平变化的作用

Fig.3 Effects of telocinobufagin on mitochondrial membrane potential and ROS in CRC cells. ***A***: Mitochondrial membrane potential; ***B***: ROS levels; ***C***: Quantitative analysis of mitochondrial membrane potential; ***D***: Quantitative analysis of ROS. *P<0.05, #P<0.01 *vs* control (0 μmol/L).

2.4 TBG引起HCT116细胞应激和凋亡通路的活化

应用蛋白免疫印迹检查凋亡相关蛋白表达，结果显示TBG引起HCT116细胞中p53、Bax表达显著升高，caspase 9和PARP蛋白出现片段化(图4A)。上述结果说明TBG诱导p53和Bax的活化，导致Caspase 9和PARP发生剪切进而激活凋亡通路(图4B)。

2.5 抗体芯片也证实TBG能引起HCT116细胞中的凋亡靶点表达改变

抗体芯片结果显示，TBG显著增加Bad磷酸化和PARP的片段化，与Western blot结果一致。磷酸化IκBα、磷酸化TAK1以及survivin的蛋白表达在TBG作用下呈下降趋势。上述结果均表明TBG可能通过调节多个应激与凋亡信号分子途径诱导CRC细胞发生凋亡。

3 讨论

蟾酥始载于唐·甄权所著《药性论》，至今已有1400多年历史。明代陈实功著《外科正宗》中蟾酥丸用于治疗痈疽恶疮；《增补万病回春》所录飞龙夺命丹以蟾酥为君药，焦树德先生建议葱白煎汤送服，用于治疗子宫颈癌、肠癌、肺癌等[7]。然而蟾酥辛、温、有毒，长期服用会产生严重的全身毒性，因此深入研究蟾酥有效成分的抗CRC活性及其机制并进行靶向改造是传统中药减毒增效的创新研发模式[9]。

TBG以剂量和时间依赖的方式抑制SW480和HCT116结肠癌细胞活力。荧光染色标记的凋亡小体，结合流式细胞术结果提示TBG降低CRC细胞活力与其诱导凋亡相关。TBG诱导线粒体膜电位降低并增加

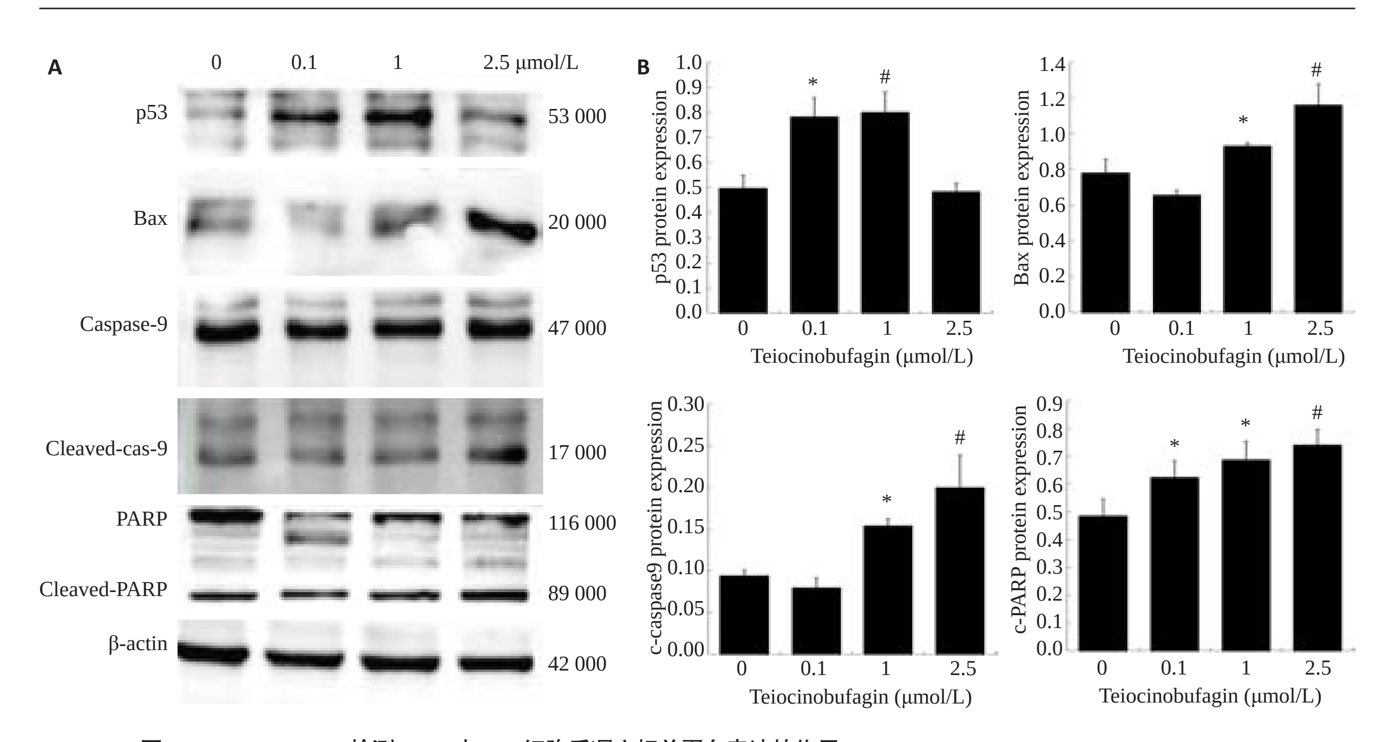


图4 Western blotting检测TBG对CRC细胞后凋亡相关蛋白表达的作用

Fig.4 Effects of telocinobufagin on expressions of apoptosis-related proteins in CRC cells. *A*: Protein expression detected by Western blotting; *B*: Semi-quantitative analysis of protein expressions. *P<0.05, #P<0.01 *vs* control (0 μmol/L).

细胞内活性氧簇(ROS)水平。HCT116包含一个野生型的p53基因,野生型p53在G1期检查DNA损伤点并启动DNA修复,若修复失败则会诱导细胞凋亡[10]。p53是ROS诱导细胞凋亡的重要调控因子,ROS可以导致DNA损伤,进而激活共济失调性毛细血管扩张/和Rad3-相关性激酶-p53通路,p53磷酸化会导致细胞周期分布发生改变,细胞中Bax表达上升,Bcl-2表达下降,细胞发生凋亡[11]。因此,TBG通过激活细胞内重要转录因子p53,上调凋亡相关基因Bax的表达导致凋亡通路的活化[6]。

聚ADP核糖聚合酶(PARP)是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶,PARP在DNA损伤断裂时被激活,作为DNA损伤的分子感受器,识别、结合到DNA断裂处,激活、催化受体蛋白的聚ADP核糖基化作用,参与DNA的修复。ROS引起DNA损伤后,有缺口DNA或DNA碎片是PARP的变构效应剂导致PARP与DNA缺口结合,活性可以增加500倍[12]。TBG可能通过诱导细胞内ROS导致DNA损伤,激活PARP而产生片段化,蛋白免疫印迹和蛋白芯片的结果均显示PARP片段化水平的增高。TBG引起的DNA损伤能够激活BAD的磷酸化[13],此前有研究表明顺铂通过细胞外信号调节蛋白激酶,提示TBG引起BAD的磷酸化可能与ROS引起的应激损伤相关。

RIP1被激活并快速募集多种衔接蛋白如TRAF2,泛素化促进TAK1的磷酸化,刺激IκB激酶IKK复合体形成,诱导IκBα磷酸化,使NF-κB从胞质转移到核内,诱导凋亡抑制蛋白(IAP)等转录,发挥抑制凋亡作用[14-15]。TAK1的活化能够引起Wnt通路的活化,而TAK1的抑制则诱导KRAS阳性CRC细胞的凋亡。我们的结果提示TBG可能通过抑制TAK1和IκBα磷酸化,前者降低KRAS和Wnt通路的活化,后者通过抑制NF-κB通路而产生凋亡诱导作用[14-15]。存活素是IAP家族成员之一,具有抑制细胞凋亡作用,高表达于大多数恶性肿瘤组织,而在终末分化成熟的正常成人组织中无表达或低表达。存活素通过抑制Caspase-3、Caspase-7阻断细胞凋亡,TBG可能通过抑制NF-κB通路,降低存活素活性进而激活Caspase依赖的通路诱导细胞凋亡[17]。

综上所述,TBG通过诱导凋亡有效抑制多种CRC细胞增殖。TBG诱导凋亡的作用一方面与其诱导ROS产生,激活p53介导的Bax通路激活导致线粒体外膜通透性有关,另一方面也与抑制TAK1和IκBα,进而阻断IAP通路相关。

参考文献:

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.

[2] Kraus S, Nabiochtchikov I, Shapira S, et al. Recent advances in personalized colorectal cancer research[J]. Cancer Lett, 2014, 347 (1): 15-21.

[3] El-Shami K, Oeffinger KC, Erb NL, et al. American cancer society colorectal cancer survivorship care guidelines[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(6): 428-55.

[4] Xu W, Jing L, Wang Q, et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution[J]. Oncotarget, 2015, 6 (30): 30017-34.

[5] 张鹏伟, 江仁望, 叶文才, 等. 中华大蟾蜍蟾酥中蟾毒内酯类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5): 841-5.

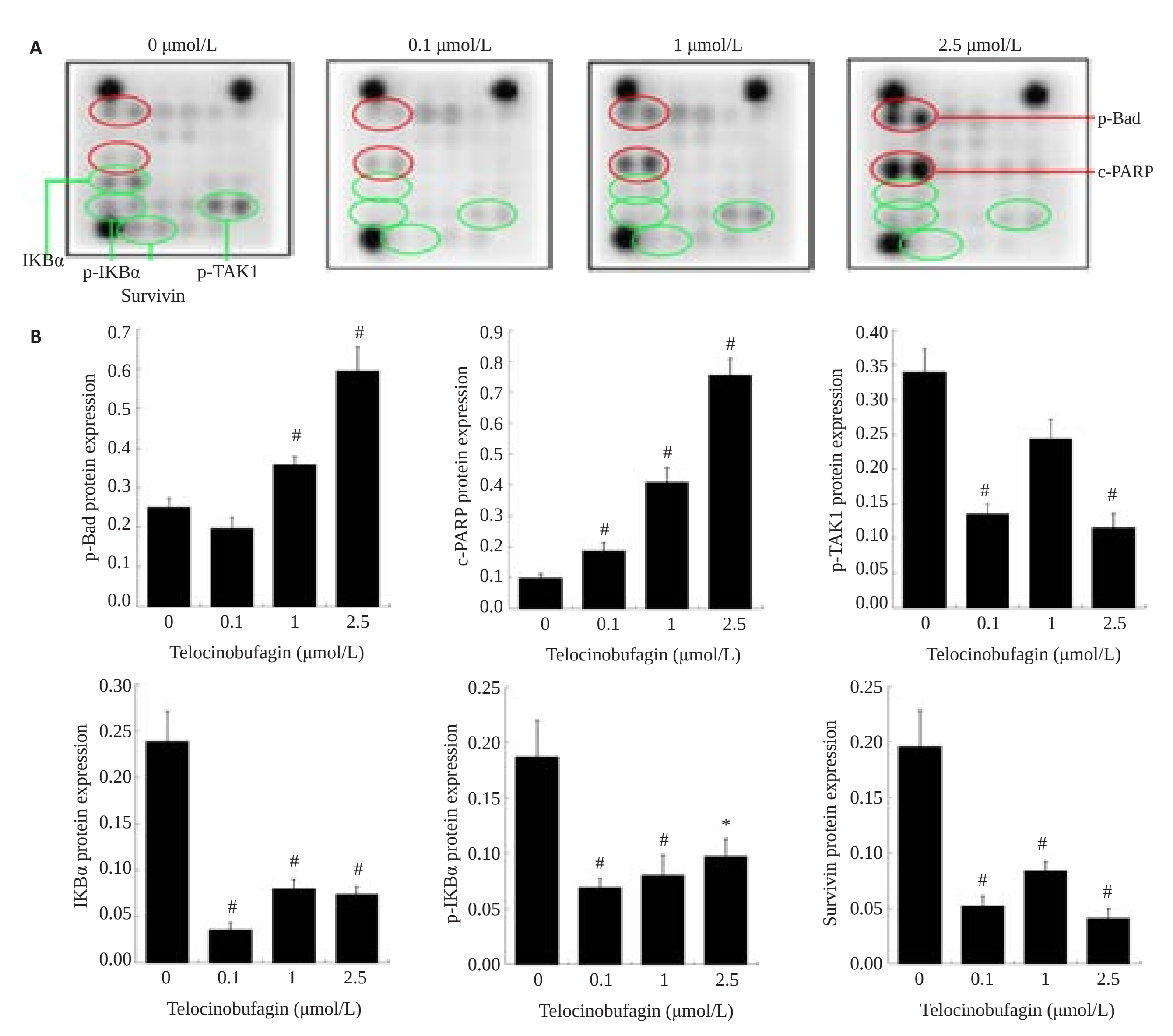


图5 TBG对CRC细胞应激与凋亡信号通路的作用

Fig.5 Effects of telocinobufagin on stress and apoptosis signaling pathway. ***A***: Expression of stress and apoptosis proteins. Red circles indicate upregulated proteins and green ones indicate down-regulated proteins; ***B***: Semi-quantitative analysis of phospho-Bad, cleaved PARP, phospho-TAK1, IKBα, phospho-IKBα and survivin in telocinobufagin-treated HCT116 cells. **P*<0.05, #*P*<0.01 *vs* control (0 μmol/L).

[6] 李玉云, 翟玮玮, 杨向荣, 等. 三七总皂苷对K562细胞增殖、凋亡及周期的影响及机制[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(8): 1103-9.

[7] 杨雨, 徐文娟, 彭康, 等. 穗花杉双黄酮通过影响caspase-3和β-catenin表达诱导结肠癌细胞SW480凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(7): 1035-8.

[8] 焦树德. 方剂心得十讲[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 274-5.

[9] Sun XG, Wu WK, Lu ZP. Chinese integrative medicine: translation toward Person-Centered and balanced medicine[J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(1): 3-6.

[10] Borralho PM, Moreira Da Silva IB, Aranha MM, et al. Inhibition of Fas expression by RNAi modulates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT116 cells expressing wild-type p53[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(1): 40-7.

[11] Jiang L, Hickman JH, Wang SJ, et al. Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses[J]. Cell Cycle, 2015, 14(18): 2881-5.

[12] Hegedus C, Virag L. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: Relevance to oxidative stress[J]. Redox Biol, 2014, 2C: 978-982.

[13] Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, et al. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal- regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin[J]. Cancer Res, 2000, 60(21): 5988-94.

[14] Carter SL, Centenera MM, Tilley WD, et al. IκBα mediates prostate cancer cell death induced by combinatorial targeting of the androgen receptor[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 141.

[15] Cheng X, Shi W, Zhao C, et al. Triptolide sensitizes human breast cancer cells to tumor necrosis factor-α-induced apoptosis by inhibiting activation of the nuclear factor-κB pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3257-64.

[16] Singh A, Sweeney MF, Yu M, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers[J]. Cell, 2012, 148(4): 639-50.

[17] Singh N, Krishnakumar S, Kanwar RK, et al. Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers[J]. Drug Discov Today, 2015, 20(5): 578-87.

（编辑:孙昌朋）